Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle)

DIE KINETIK DER Na-K-ATPase IM LYOPHILISIERTEN NIERENGEWEBE VOM MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Adolf Hornstein
aus Reutlingen

1977

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle)

DIE KINETIK DER Na-K-ATPase IM LYOPHILISIERTEN NIERENGEWEBE VOM MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hermann Adolf Hornstein
aus Reutlingen

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. J. Mallach

1. Berichterstatter: Doz. Dr. med. U. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Bohle
   Korreferent: Doz. Dr. rer. nat. A. Wendel

MEINEN ELTERN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523720_0080

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL, METHODE UND VERSUCHSABLAUF	3
	A. Material	3
	B. Methode und Versuchsablauf	4
	1. Gewebspräparation	4
	2. Homogenisieren	5
	3. Gefrieren	5
	4. Gefriertrocknen	6
	5. Auftauen und Wiegen	7
	6. Biochemische Analyse der NaKATPase	7
	C. Bezugsquellen der benutzten Substrate und Reagentien	11
III.	ERGEBNISSE	12
	a. Ouabaineffekt auf die ATPasen	12
	b. Wirkung von Desoxycholat auf die ATPasen	13
	c. Wirkung von Magnesium auf die ATPasen	15
	d. ATP-Wirkung auf die NaKATPase-Aktivität	16
	e. Wirkung von Na-Ionen auf die Aktivität der NaKATPase	17
	f. Wirkung von K-Ionen auf die Aktivität der NaKATPase	18
	g. ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Enzymmenge	19
IV.	DISKUSSION	22
	A. Methode	22
	B. Ergebnisse	24
V.	ZUSAMMENFASSUNG	30
VI.	ZAHLENTABELLEN	32
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	34

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
DOC	Desoxycholat
Glu-1-P	Glukose-1-Phosphat
Glu-6-P	Glukose-6-Phosphat
Glu-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)
MgATPase.....	durch Mg^{++} stimulierbare Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3)
MKH	Mol umgesetztes Substrat pro kg Trockengewicht pro Stunde
NADP ($NADPH_2$)..	Nikotinamidadenindinukleotid-Phosphat
NAD ($NADH_2$) ...	Nikotinamidadenindinukleotid
NaKATPase	durch Na^+ und K^+ stimulierbare Adenosintriphosphatase (EC 3.6.1.3)
PE	Polyäthylen
6-PGluAc	6-Phosphoglukonat
PGM	Phosphoglukomutase (EC 2.7.5.1)
P_i	anorganisches Phosphat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
$\bar{x}$	Mittelwert

I.) EINLEITUNG

Ein gemeinsames Merkmal aller lebenden Zellen ist die Fähigkeit eine unterschiedliche Ionenverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Raum aufrecht zu erhalten. So liegt im Zellinneren ein hoher Kalium- und ein niedriger Natriumgehalt vor, während außerhalb der Zelle ein hoher Natrium- und ein niedriger Kaliumgehalt zu beobachten ist (in der Regel verhält sich Na^+: K^+ in der Zelle wie 1:20, dagegen Na^+: K^+ im extrazellulären Raum wie 30:1).

Diese Konzentrationsdifferenzen zu beiden Seiten der für Ionen im unterschiedlichen Ausmaß permeablen Zellmembran führen zur Ausbildung von osmotischen und elektrochemischen Gradienten der Zelle gegenüber ihrer Umwelt.

Die Zelle bewerkstelligt die Aufrechterhaltung dieser Gradienten nach der heutigen Vorstellung u.a. durch sogenannte Pumpen, die aktive und somit gerichtete Transportvorgänge unterhalten. Hierher gehört die Na-K-Pumpe, die den transepithelialen Na^+- und K^+- Austausch beschleunigt.

Bei der Na-K-Pumpe handelt es sich um ein in den Zellmembranen lokalisiertes Enzymsystem, der sogenannten NaKATPase, die die für ihre Aktivität notwendige Energie aus der hydrolytischen Spaltung von ATP zu ADP unter Freisetzung von anorganischem Phosphat bezieht. Sie ist durch Na^+ und K^+ stimulierbar und läßt sich mit Ouabain und anderen Herzglykosiden spezifisch hemmen.

Nachdem Skou 1957 (26) die NaKATPase im Nervengewebe des Krebses entdeckt hatte, wurde das Enzym im Homogenat oder in Membranfraktionen aus dem Homogenat vieler Gewebe der unterschiedlichsten Spezies gefunden und beschrieben.

Die im Homogenat gefundenen Aktivitätswerte der NaKATPase geben jedoch keine Auskunft über Lokalisation und quantitative Verteilung des Enzyms innerhalb den Strukturen eines Organs. Es ist somit auch keine Zuordnung der Aktivität des Enzyms zu einzelnen Funktionseinheiten in einem Organ möglich. Dies

fällt besonders beim Nierengewebe ins Gewicht, da hier ein ausgeprägt heterogen strukturiertes Parenchym vorliegt, dessen Einheit, das Nephron, sich in morphologisch und funktionell unterscheidbare Abschnitte gliedern läßt.

Mit Hilfe ultramikrochemischer Analysenmethoden, z.B. der sogenannten Lowry-Technik, gelingt es jedoch Enzymaktivitäten im Verlauf des Nephrons, d.h. in anatomisch unterscheidbaren Nephronabschnitten zu messen.

Bisher wurde mit dieser Methode nur die Verteilung der NaKATPase im Nephron der Rattenniere untersucht, wohingegen die Verteilung des Enzyms im Nephron der menschlichen Niere unbekannt ist.

Da die Lowry-Technik an aus lyophilisiertem Gewebe dissezierten Teilchen arbeitet, ist Voraussetzung für ihre Anwendung am menschlichen Nierengewebe die Kenntnis der zur vollen Aktivitätsentfaltung der NaKATPase notwendigen optimalen Bedingungen. Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Arbeit die Kinetik der NaKATPase an lyophilisiertem Homogenat aus menschlichem Nierengewebe zu erstellen. Das hierzu verwendete Gewebe entstammt aus einer operativ entfernten Niere. Außerdem sollen die gefundenen Ergebnisse mit ähnlichen kinetischen Untersuchungen des Enzyms, die von anderen Autoren durchgeführt wurden, verglichen werden.

II.) MATERIAL, METHODE UND VERSUCHSABLAUF

A.) Material:

Bei dem zur Enzymanalyse verwendeten Gewebe handelt es sich um den makroskopisch und histologisch unauffälligen Anteil eines Operationspräparates der linken Niere einer 53-jährigen Frau.

Wie die makroskopische Betrachtung des Operationspräparates ergab, befand sich am oberen Pol der Niere ein 16 x 12 x 3,5 cm messender Tumor, der sich scharf von der glatten, unauffälligen Oberfläche des 8 x 5 x 3,5 cm großen Organs abgrenzte. Im Frontalschnitt ließen sich im Nierenparenchym regelrecht ausdifferenzierte Lobuli renalis mit deutlicher Rinden-Markgrenze erkennen. Die Papillen und das Nierenbeckenkelchsystem sowie der Ureter und die A. et V. renalis waren ebenfalls makroskopisch unauffällig.

Histologisch wurde auf Grund des andeutungsweise drüsig, jedoch überwiegend alveolär und trabekulär aufgebauten Tumorgewebes der Befund eines hypernephroiden Karzinoms erhoben. Das Nierenparenchym, das zur Enzymanalyse verwendet wurde, erwies sich lichtmikroskopisch als unauffällig und regelrecht ausdifferenziert. Es ergaben sich auch keinerlei Anhaltspunkte, die auf einen Schockzustand der Niere hätten schließen lassen, z.B. im Sinne einer Dilatation der Tubuli.

B.) Methode und Versuchsablauf:

Der in dieser Arbeit abgehandelten Enzymkinetik ist eine modifizierte Methode der Homogenatsaufarbeitung nach Schmidt und Dubach zugrunde gelegt (24). Dabei wurde das Nierenparenchym in Rinde und äußeres Mark aufgetrennt.

Die Methode und der Versuchsablauf läßt sich wie folgt gliedern:

1.) Gewebspräparation:

Zehn Minuten nach der operativen Abklemmung der A. et V. renalis und sofort nach der Exstirpation der oben beschriebenen menschlichen Niere wurde diese auf einem Korkbrett mit einem Messer in ca. 1 cm dicke Längsscheiben zerlegt, die ihrerseits durch Schnittführung entlang der Columnae renalis in Markpyramiden mit dem sie umgebenden Rindenmantel aufgeteilt wurden.

Nierenlängsscheibe:

(1)Aufteilung der Scheibe entlang der Columnae renalis.
(2) und (3) kennzeichnen die Zonen aus denen das Mark- bzw. Rindengewebe für die kinetische Analyse entnommen wurde.
Erläuterung siehe Text.

Das Rindengewebe wurde aus der ca. 2 mm breiten Rindenaußenzone herauspräpariert. Dadurch wurde vermieden, daß Markstrahlen mit in das Rindenhomogenat gelangten.

Das äußere Markgewebe wurde aus der Außenzone des Marks gewonnen, die sich durch ihre dunkle, meist blaurote Eigenfärbung von der umgebenden Rinde, aber auch der hellerfarbigen Anteile der Innenzone des Marks unterscheidet.

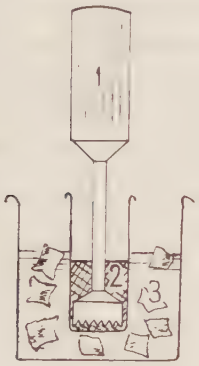
2.) Homogenisieren:

Zunächst wurde das Gewebe nach Rinde und Mark aufgeteilt und getrennt in mit 0,9%-iger, eiskalter NaCl-Lösung gefüllte Bechergläser gegeben und gewogen. Aus dem Differenzgewicht von

(Becherglas+NaCl-Lösung+Gewebe)-(Becherglas+NaCl-Lösung)

ließ sich das Naßgewicht von Rinde und Mark bestimmen. Anschließend wurde das Gewebe im Verhältnis

Naßgewicht des Gewebes : Aqua bidest = 1 : 8



Homogenisieren mit dem Ultra-Turax-Gerät:
(1) Ultra-Turax-Homogenisator
(2) Gefäß mit Homogenat
(3) Eisbad

mit eiskaltem Aqua bidest versetzt und schonend mit einem Ultra-Turax-Gerät homogenisiert. Um eine Erwärmung des Gewebes während des Homogenisierens durch die dabei auftretende Reibung zu verhindern, war das Homogenatsgefäß in ein mit Eis gefülltes Becherglas eingetaucht, und das Ultra-Turax-Gerät wurde in Intervallen von je 5 Sekunden mit dazwischenliegenden 10 Sekunden dauernden Pausen eingeschaltet.

3.) Gefrieren:

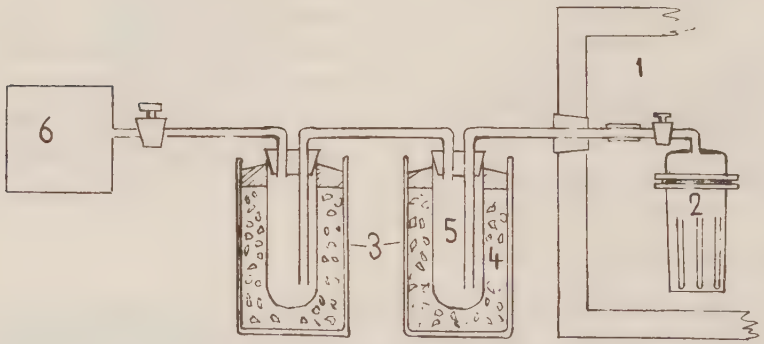
Das Rinden- und Markhomogenat wurde in Portionen zu je 100 µl mit einer Enzympipette in Mikroteströhrchen abgefüllt. Diese tauchte man anschließend in eine mit einem Aceton-Trokkeneisgemisch (-70° C) gefüllte Petrischale. Durch den schnell ablaufenden Gefriervorgang des Gewebes bei einer Temperatur unterhalb seines eutektischen Punktes, der für Gewebe bei ca. -60° C liegt, ist eine optimale Fixierung des Gewebsmetabolismus gewährleistet (1). Anschließend wurden die Röhrchen in eine auf -40° C vorgekühlte Lyophilisierflasche gestellt.

4.) Gefriertrocknen:

Um eine gute Aktivitätserhaltung der Enzyme im Gewebe über lange Zeit zu gewährleisten, wurde das Gewebe 24 Stunden lang bei einem Vakuum von 5×10^{-3} Torr und einer Temperatur von -40° C gefriergetrocknet.

Dazu wurde die luftdicht verschließbare Lyophilisierflasche mit ihrem Inhalt in eine Tiefkühltruhe (-40° C) gestellt und mit einer Vakuumpumpe (5×10^{-3} Torr) verbunden. In das Vakuumsystem wurden zwei Kältefallen geschaltet, die einen Temperaturabfall zwischen Homogenat und System bewirkten. Das dadurch erzeugte Wasserdampfdruckgefälle führte zu einem raschen Ableiten des Wasserdampfes aus dem Gewebe. Die Kältefallen bestanden aus zwei Saugflaschen, die in mit Aceton und Trockeneis gefüllte Dewar-Gefäße eingetaucht waren.

Nach dem Gefriertrocknen wurden die Lyophilisierflaschen in der Tiefkühltruhe gelagert.



Lyophilisieranlage: (1) Tiefkühltruhe, (2) Lyophilisierflasche mit Mikroteströhrchen, (3) Kältefallen, bestehend aus mit Aceton und Trockeneis gefüllten Dewar-Gefäßen (4) und darin eingetauchten Saugflaschen (5). (6) Vakuumpumpe. Erklärung siehe Text.

5.) Auftauen und Wiegen:

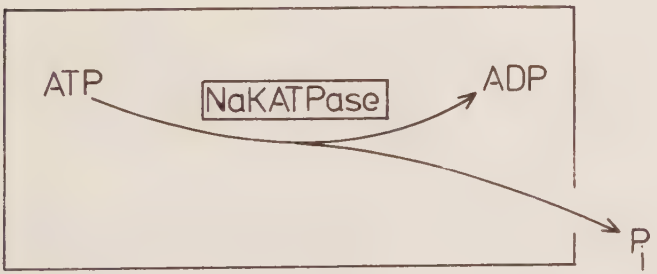
Zum Auftauen wurde die Lyophilisierflasche an das Vakuumsystem angeschlossen und ca. 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur aufgetaut. Um die Feuchtigkeitsaufnahme und die damit verbundene Gewichtszunahme des lyophilisierten Gewebes auf ein Minimum zu reduzieren, wurde die Lyophilisierflasche in einer Klimakammer (18^0 C, 40% relative Luftfeuchtigkeit) geöffnet und das Homogenat aus einem Mikroteströhrchen mit einem Spatel entnommen. Die Wägung des Homogenats erfolgte auf einer Cahn-G 2-Waage mit einem Empfindlichkeitsbereich von 50 ng bis 2,5 g.

6.) Biochemische Analyse der NaKATPase
Allgemeiner Reaktionsablauf:

Die Analyse der NaKATPase gliedert sich in 4 Schritte:

a) Der erste Schritt umfaßt die hydrolytische Spaltung von ATP zu ADP durch die im Homogenat enthaltenen ATPasen (Total-ATPase) unter Freisetzung einer zu ihrer Aktivität proportionalen Menge von anorganischem Phosphat.

ATPase-Reaktion



Da die Erfassung des Aktivitätsanteils der NaKATPase vor allem durch die spezifische Hemmbarkeit des Enzyms durch Glykoside indirekt möglich ist (24), läßt man diesen ersten Reaktionsschritt in zwei verschiedenen Medien ablaufen.

Medium A repräsentiert die Total-ATPase, da es sämtliche für die ATPasen notwendigen Aktivatoren enthält:

Tabelle 1:

Puffer	Substrat	Hilfsenzyme	Zusätze
Tris 0, 1M, pH 7,4	2 mM ATP	—	50 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$ 0,1 mM EDTA 0,05 % BSA 5 mM KCl

Medium D repräsentiert die Ouabain -insensitive MgATPase, d.h. bei diesem Medium wird durch den Zusatz von Ouabain und die Abwesenheit von Kaliumionen die NaKATPase nicht mit erfaßt.

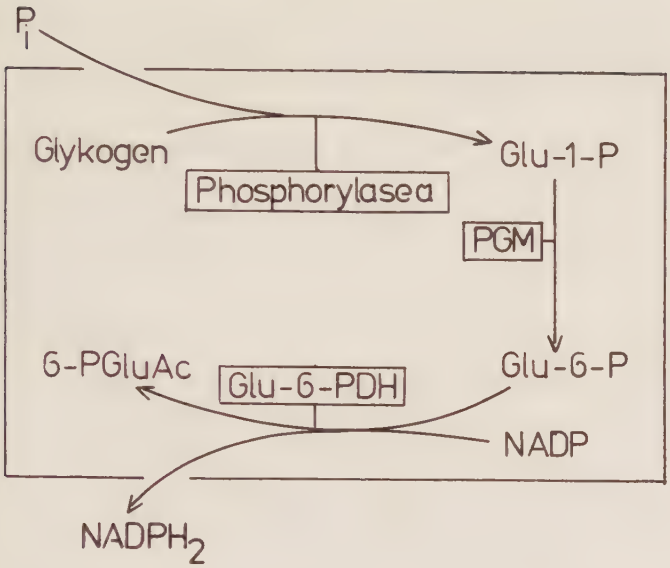
Tabelle 2:

Puffer	Substrat	Hilfsenzyme	Zusätze
Tris 0,1M, pH 7,4	2 mM ATP	—	50 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$ 0,1 mM EDTA 0,05 % BSA 10^{-2} M Ouabain

Die Differenz der Spaltungsraten von ATP im Medium A und Medium D entspricht der Aktivität der NaKATPase.

b) Im zweiten Schritt wird das bei der hydrolytischen Spaltung von ATP freigesetzte, anorganische Phosphat an Glukose gebunden, die aus der Phosphorylasereaktion stammt. Das entstandene Glu-1-P wird in G-6-P überführt, das mit Hilfe der G-6-PDH unter Reduktion von NADP zu $NADPH_2$ zu 6-PGluAc oxydiert wird. Das $NADPH_2$ entsteht dabei proportional zur freigesetzten Menge anorganischen Phosphats.

Phosphor-Analyse



Zusammenstellung des Phosphoranalysenmediums:

Tabelle 3:

Puffer	Substrat	Hilfsenzyme	Zusätze
Imidazol 0,05 M,pH 6,9	Glykogen 0,08% NADP 0,293 mM	Phosphorylase 35 µg/ml PGM 3 µg/ml Glu-6-PDH 1 µg/ml	$MgCl_2$ 0,5 mM EDTA 1 mM BSA 0,05% 5'AMP 0,01 mM

c) Am Ende der biochemischen Analyse steht der Nachweis des aus NADP durch Reduktion entstandenen $NADPH_2$ mit Hilfe der hochempfindlichen Fluorimetrie, mit der sich noch Konzentrationen bis zu 10^{-12}M $NADPH_2$ selektiv messen lassen.

d) Die Aktivität der NaKATPase errechnet sich aus der Differenz zwischen der Aktivität der Total-ATPase und der Aktivität der Ouabain-insensitiven MgATPase.

Praktisches Vorgehen:

Nach dem Wiegen wurde das Homogenat mit eiskaltem Aqua bidest versetzt, so daß eine Endkonzentration[1)] von 800 ng Homogenat / 10 µl[2)] H_2O gegeben war. Anschließend wurde in Polyäthylen-Röhrchen (PE-Röhrchen), die sich im Eisbad befanden, zu je 10 µl Homogenatsverdünnung Analysenmedium A bzw. Analysenmedium D hinzupipettiert, wobei die Konzentration der sich in diesen Lösungen befindlichen Stoffe so gewählt wurde, daß für alle Versuche dieselben Ausgangs-Konzentrationen vorlagen, mit Ausnahme des zu untersuchenden Parameters, der in Form einer Verdünnungsreihe den Versuch modifizierte.

Das Aufteilen der Reaktionsansätze in je 3 PE-Röhrchen ermöglichte eine Dreifachbestimmung jedes Wertes. Die NaKATPase-Reaktion wurde nun durch die Inkubation der PE-Röhrchen bei 37° C eingeleitet und nach 30 Minuten durch einen 90 Sekunden dauernden Kochstop beendet.

Nach dem Abkühlen wurden die PE-Röhrchen 2 Minuten bei 15000 U/Min. zentrifugiert und anschließend in jedes Röhrchen 200 µl Phosphoranalysenmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) hinzupipettiert.

Während der nun folgenden 60-minütigen Inkubation bei 37° C wurde das bei der ATP-Spaltung entstandene Phosphat in die äquivalente Menge $NADPH_2$ umgesetzt. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß das entstandene $NADPH_2$ durch eine Endpunktbestimmung fluorimetrisch analysiert werden konnte. (Anregungswellenlänge 365 nm, Abstrahlungswellenlänge 480 nm.)

Um die so gewonnenen Werte auch quantitativ zu erfassen, wurde bei jedem Versuch eine Phosphatstandard-Verdünnungsreihe und ein Leerwert mitgeführt.

1) In der Endkonzentration ist die Verdünnung, die durch Zusatz von Analysenmedium A bzw. D verursacht wurde, berücksichtigt.

2) Bei diesem Wert ist keine Abweichung der Hydrolysengeschwindigkeit, hervorgerufen durch Substratverarmung oder Produkthemmung, zu befürchten (s. Seite 19).

Die Berechnung der Enzymaktivität in MKH erfolgte nach der Formel:

$$\text{Enzymaktivität (MKH)} = \frac{\text{Standardkonz.(Mol/l)} \cdot \text{Probenfluoresz.} \cdot \text{Pipettenvol.(l)}}{\text{Standardfluoresz.} \cdot \text{Probengewicht(kg)} \cdot \text{Inkub.-zeit(Std.)}}$$

Pipettenvolumen: $10 \cdot 10^{-6}$ l

Inkubationszeit: $\frac{1}{2}$ Std.

= Differenz aus Testwert minus Leerwert.

C.) Bezugsquellen der benutzten Substrate und Reagentien

Phosphorylase, Glykogen und Rinderserumalbumin:
SIGMA CHEMICAL COMPANY

Ouabain (Strophanthinum G):
SANDOZ AG.

Alle anderen Enzyme und Substrate:
BOEHRINGER GMBH Mannheim

III.) ERGEBNISSE[1)]

a) Ouabaineffekt auf die ATPasen:

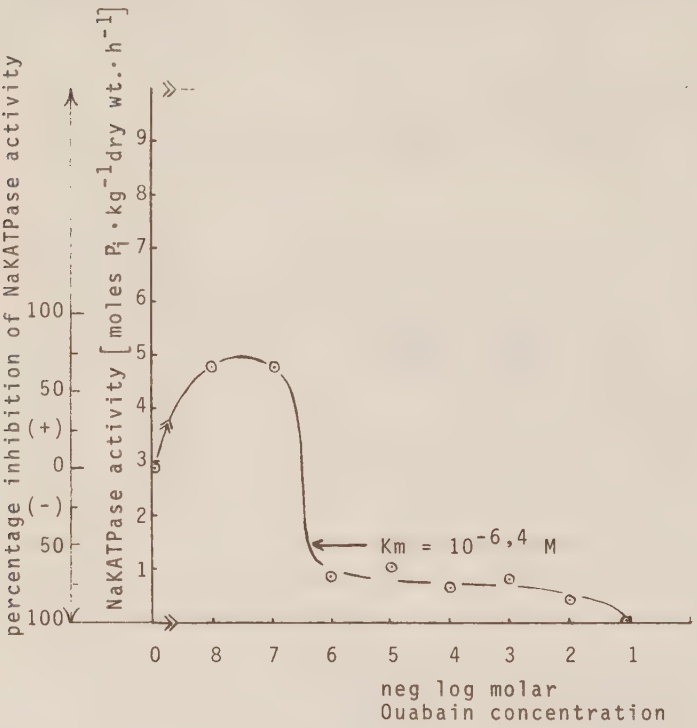


Abb.1

Einfluß der Ouabainkonzentration auf die NaKATPase im lyophilisierten Nierenmarkhomogenat des Menschen. Das Ouabain wurde in steigender Konzentration dem Medium A zugesetzt (⊙ - ⊙).
Die MgATPase-Aktivität wurde im Medium D bei einem Zusatz von 10^{-2} M Ouabain ermittelt. Der so erhaltene Wert wurde mit der vollständigen Hemmung der NaKATPase (100%) gleichgesetzt.
Die halbmaximale Hemmung der NaKATPase (s.Pfeil) liegt bei einer Ouabainkonzentration von $10^{-6,4}$ M.
Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

[1)] Die Aktivitätswerte, die sich bei den einzelnen Versuchen ergaben, sind am Ende der Arbeit in Tabellen zusammengefaßt.

Ouabain (Strophantin G) gilt, wie auch andere herzwirksame Glykoside, als spezifischer Hemmstoff der NaKATPase.

Wie aus Abb.1 ersichtlich ist, tritt eine annähernd vollständige Hemmung der NaKATPase (97,6%) bei einer Ouabainkonzentration von $10^{-1,19}$ M auf. Auffallend ist der sprunghafte Übergang von hemmender zu stimulierender Wirkung des Ouabains im Bereich zwischen 10^{-6} M und 10^{-7} M. So wird die halbmaximale Hemmung bei $10^{-6,4}$ M Ouabain erreicht, während bei 10^{-7} M Ouabain noch eine 63,6%ige Stimulierung der NaKATPase zu beobachten ist.

b) Wirkung von Desoxycholat auf die ATPasen:

Untersucher, die die NaKATPase in gereinigten Membranfraktionen messen, verwenden häufig Desoxycholat, da dieses Detergenz in einem bestimmten Konzentrationsbereich durch eine Herauslösung von Phospholipiden aus den Membransystemen eine Freilegung der NaKATPase bewirkt (19) und dadurch zu einer Steigerung der Enzymaktivität führt.

Aus Abb.2 geht hervor, daß am menschlichen Nierenmarkhomogenat die Zunahme der Total-ATPase-Aktivität allein auf einer Stimulierung der NaKATPase, die bei 10^{-3} M Desoxycholat ihr Maximum erreicht hat, beruht (86% Stimulation gegenüber einer Vorinkubation des Homogenats in reinem H_2O), da bis zu einer Konzentration von 10^{-3} M Desoxycholat keine Veränderung der MgATPase-Aktivität zu beobachten ist. Desoxycholat-Konzentrationen über 10^{-3} M bewirken einen steilen Abfall sowohl der MgATPase als auch der NaKATPase-Aktivität. Bereits bei 10^{-2} M Desoxycholat tritt eine annähernd vollständige Hemmung der Enzyme auf.

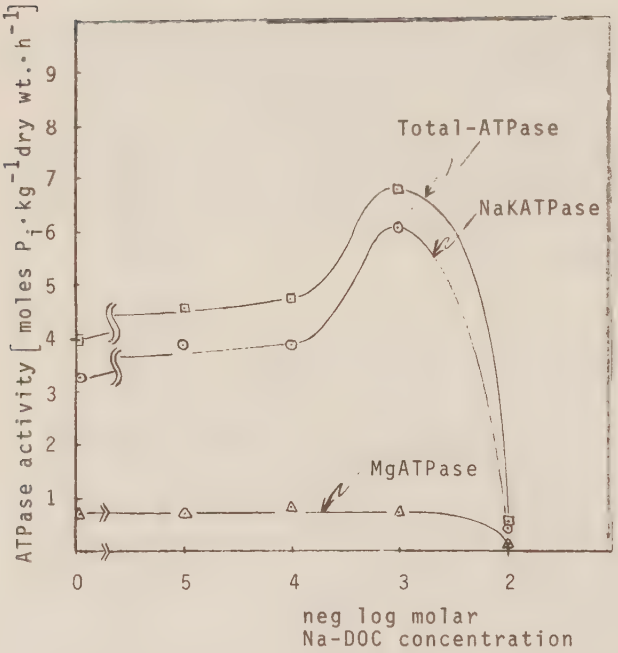


Abb.2

Wirkung von Desoxycholat auf die Aktivität der ATPasen des lyophilisierten menschlichen Nierenmarkhomogenats. Das Homogenat wurde 30 Minuten bei 0^{o} C vorinkubiert. Das Vorinkubationsmedium enthielt in einem Imidazolpuffer (50 mM, pH 6,9) EDTA (2 mM) und eine steigende Konzentration von Desoxycholat (10^{-5} M bis 10^{-2} M). Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

c) Wirkung von Magnesium auf die ATPasen:

Abb.3 demonstriert die Aktivitätskurven der NaKATPase und der MgATPase des lyophilisierten Markhomogenats der menschlichen Niere in Abhängigkeit von der Mg^{++}-Konzentration. Bei der Analyse wurde die ATP-Konzentration bei 2 mM konstant gehalten.

Der hyperbole Kurvenverlauf der NaKATPase-Aktivität (o-o) zeigt einen breiten Gipfel zwischen 2 und 3 mM Mg^{++}. Bei höheren Mg^{++}-Konzentrationen tritt eine deutliche Hemmung der NaKATPase ein, nicht jedoch der MgATPase (Δ - Δ), deren Aktivität nach steilem Anstieg im Bereich von 2 bis 6 mM Mg^{++} völlig konstant bleibt. Auffallend ist, daß die MgATPase bei 0 mM Mg^{++} 53,8% ihrer Maximalaktivität zeigt, während die NaKATPase bei Fehlen von Mg-Ionen keine Aktivität aufweist.

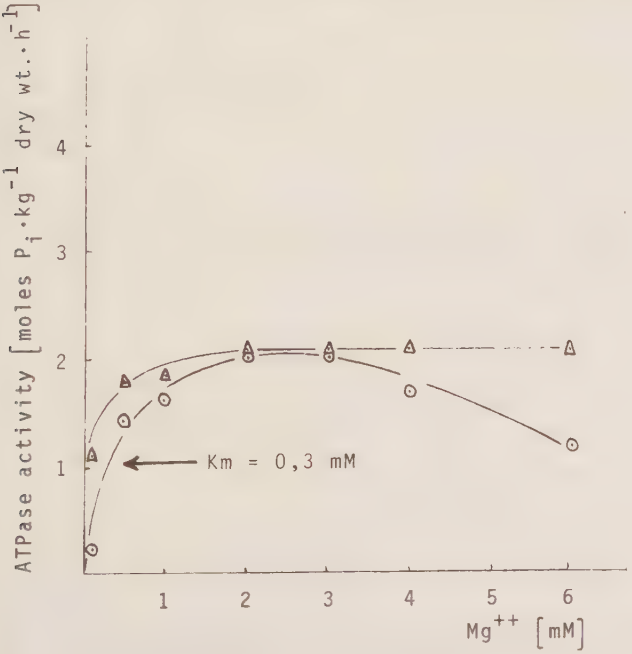


Abb.3

Einfluß der Mg^{++}-Konzentration auf die Aktivität der NaKATPase (o-o) und der MgATPase (Δ - Δ) im lyophilisierten Nierenmarkhomogenat des Menschen. Jeder Wert der Kurven stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

d) ATP-Wirkung auf die NaKATPase-Aktivität:

Die Beziehung zwischen der Aktivität der NaKATPase und ATP, das das spezifische Substrat für die NaKATPase ist, geht aus Abb.4 hervor.

Wie zu erwarten nimmt mit steigender Substratkonzentration die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Maximalwert bei 3 mM ATP zu. Bei höheren Substratkonzentrationen wird jedoch keine Sättigungscharakteristik erreicht, es tritt vielmehr eine Hemmung der NaKATPase ein, die bei 5 mM ATP bereits 20% der Maximalaktivität beträgt.

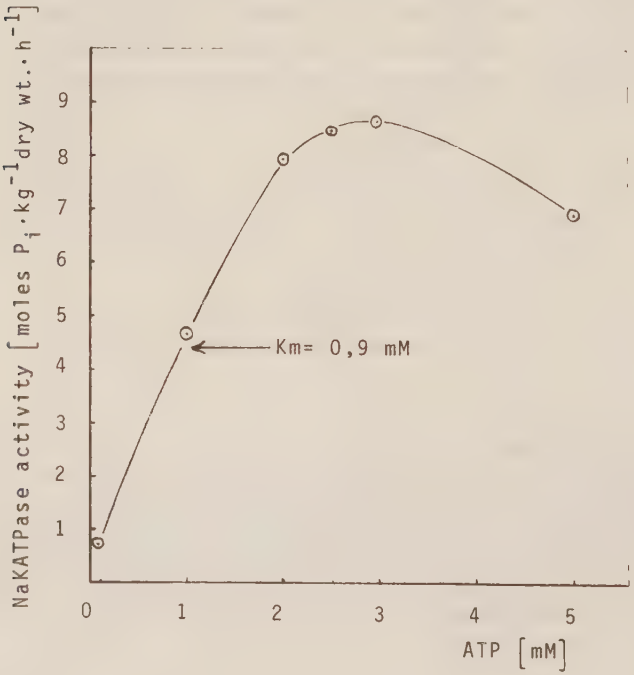


Abb.4

Einfluß der ATP-Konzentration auf die Aktivität der NaKATPase im lyophilisierten Nierenmarkhomogenat des Menschen.
Bei einer ATP-Konzentration von 0,9 mM wird die halbmaximale Aktivierung der NaKATPase erreicht.
Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

e) Wirkung von Na-Ionen auf die Aktivität der NaKATPase:

Die Abhängigkeit der Aktivität der NaKATPase von der Na^+-Konzentration bei einer konstanten K^+-Konzentration von 5 mM ist in Abb.6 wiedergegeben.

Halbmaximale Aktivität des Enzyms wird bei ca. 4,8 mM Na^+, maximale Aktivität bei 50 mM Na^+ erreicht. Eine weitere Erhöhung der Na^+-Konzentration verursacht eine zunehmende Hemmung der NaKATPase.

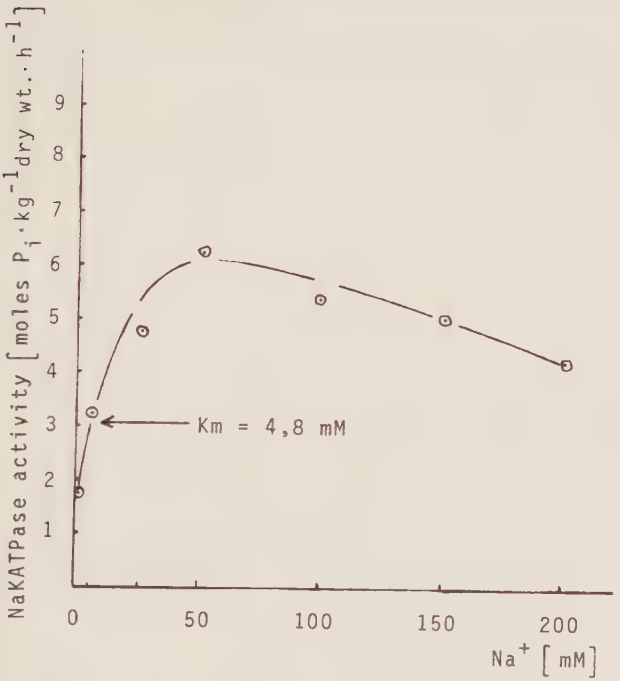


Abb.6

Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Aktivität der NaKATPase im lyophilisierten Nierenmarkhomogenat des Menschen.
Die halbmaximale Aktivierung der NaKATPase liegt bei einer Na^+-Konzentration von ca. 4,8 mM.
Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

f) Wirkung von K-Ionen auf die Aktivität der NaKATPase:

Abb.5 zeigt den Einfluß einer K^+-Konzentrationserhöhung von 0 bis 40 mM bei unveränderter Na^+-Konzentration von 50 mM auf die Aktivität der NaKATPase.

Dabei bewirkt eine geringfügige Zugabe von K^+-Ionen zum Analysenmedium A einen steilen Anstieg der Aktivität der NaKATPase, so daß die zur halbmaximalen Aktivierung des Enzyms notwendige K^+-Konzentration bei 0,3 mM liegt. Der Anstieg geht bereits bei 5 mM K^+ in eine konstante Aktivität über. Eine signifikante Hemmung der NaKATPase durch weitere Zugabe von K^+ ist erst ab einer Konzentration von 20 mM K^+ zu verzeichnen.

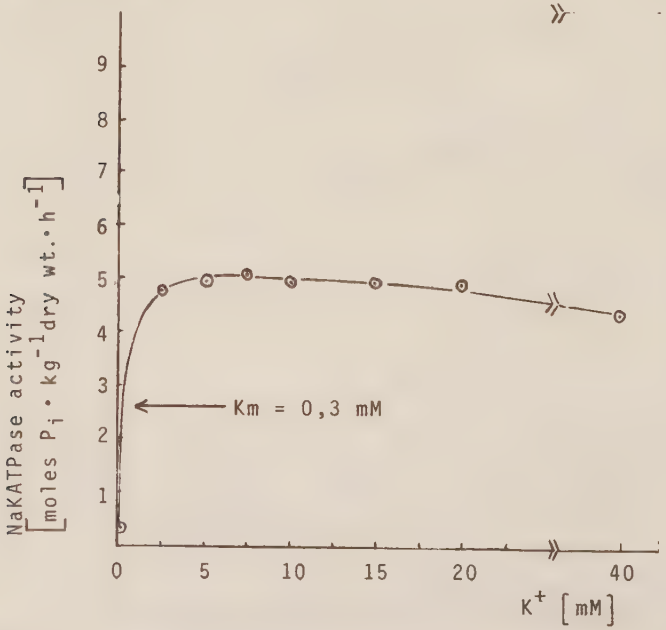


Abb.5

Einfluß der K^+-Konzentration auf die Aktivität der NaKATPase im lyophilisierten Nierenmarkhomogenat des Menschen.
Die halbmaximale Aktivierung der NaKATPase liegt bei einer K^+-Konzentration von ca. 0,3 mM.
Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

g) ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Enzymmenge:

Abb.7 veranschaulicht die Hydrolysenrate von ATP in Abhängigkeit von einer steigenden Homogenatmenge vom menschlichen Nierenmark bzw. Nierenrinde.

Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Hydrolysengeschwindigkeit und Enzymkonzentration im Bereich zwischen 0 und 1600 ng Homogenat / 10 µl Ansatz.

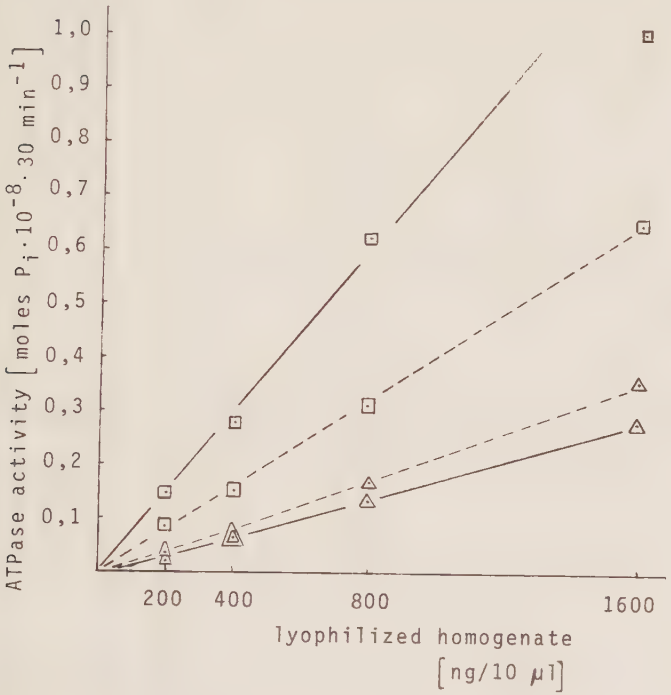


Abb.7

Einfluß steigender Nierenhomogenatsmengen auf die hydrolytische Spaltung von ATP.
Jeder Wert der Kurve stellt einen Mittelwert aus drei Analysen dar.

⊡ ——— ⊡ Total-ATPase im Markhomogenat
▲ ——— ▲ MgATPase im Markhomogenat
⊡ ----- ⊡ Total-ATPase im Rindenhomogenat
▲ ----- ▲ MgATPase im Rindenhomogenat

In Tabelle 4 sind die Aktivitätswerte der ATPasen von Rinde und Mark, ihr jeweiliger prozentualer Anteil der Total-ATPase und der NaKATPase / MgATPase Quotient aufgeführt.

Tabelle 4

	Homogenatkonzentration ng/10 µl	Total-ATPase MKH	MgATPase MKH	NaKATPase MKH	Total-ATPase/MgATPase-Quotient
Äußere RINDE	1606	8,20	4,62	3,58	
	803	7,80	4,44	3,36	
	401	8,13	3,46	4,67	2,08
	200	8,90	3,35	5,55	
		$\bar{x}$ = 8,25	$\bar{x}$ = 3,96	$\bar{x}$ = 4,92	
prozentualer Anteil an der Total-ATPase-Aktivität			48,00%	52,00%	

	Homogenatkonzentration ng/10 µl	Total-ATPase MKH	MgATPase MKH	NaKATPase MKH	Total-ATPase/MgATPase-Quotient
Äußeres MARK	1596	13,06	3,61	9,45	
	798	15,61	3,44	12,17	
	399	14,04	3,47	10,57	4,43
	199	15,45	2,60	12,85	
		$\bar{x}$ = 14,54	$\bar{x}$ = 3,28	$\bar{x}$ = 11,26	
prozentualer Anteil an der Total ATPase-Aktivität			22,55%	77,44%	

Es ist ersichtlich, daß im Mark der Anteil der NaKATPase an der Total-ATPase mit 77,4% auffallend hoch ist, ebenso der Total-ATPase/MgATPase Quotient mit 4,43. In der Rinde sind die entsprechenden Werte niedriger(52,00% ; 2,08).

Vergleicht man die entsprechenden absoluten Aktivitätswerte des Marks mit denen der Rinde, so ergibt sich im Mark eine Aktivitätszunahme der Total-ATPase um das 1,8fache, der NaKATPase aber um das 2,9fache. Die Diskrepanz zwischen 1,8 und 2,9 rührt daher, daß die MgATPase-Aktivität in der Rinde um das 1,2fache höher ist als im Mark.

IV.) DISKUSSION

A.) Methode

Vergleicht man die kinetischen Untersuchungen der NaKATPase in der Literatur miteinander (3, 15, 16, 17, 20, 23, 24, 30, 32), so fällt auf, daß zu ihrer Erarbeitung sehr unterschiedliche Methoden eingesetzt wurden und daß die gewonnenen Ergebnisse wesentlich von der Art der jeweiligen Methoden geprägt sind.

Bei der NaKATPase handelt es sich um ein membrangebundenes Enzymsystem, weshalb viele Autoren die Membranfraktion als Quelle des Enzyms bevorzugen, wobei aber eine zusätzliche Vorbehandlung der Fraktionen mit Desoxycholat (DOC) in einem bestimmten Konzentrationsbereich erforderlich ist, um einen genügend hohen Aktivitätswert zu erhalten.

Obwohl die DOC-Methode eine hohe absolute NaKATPase-Aktivität erbringt sind Bedenken angezeigt:
So hat z.B. die Dichtegradientenzentrifugation, die zur Gewinnung der Membranfraktionen angewandt wird, den Nachteil, daß es durch die mit ihr verbundenen zeitlich aufwendigen Reinigungen der Fraktionen zu einer zunehmenden Labilität des membrangebundenen Enzymsystems (20) und zu einer Konformationsänderung des Enzymmoleküls (25) kommen kann. Da sich die NaKATPase und die MgATPase gegenüber Schädigungen während des Präparationsvorganges unterscheiden (20), führt dies zusätzlich zu einer Veränderung der Aktivitätsrelation zwischen beiden ATPasen.

Hinsichtlich der Vorbehandlung von Homogenat bzw. der Zellfraktionen mit DOC ist zu bedenken, daß das DOC in der Lage ist, vermutlich über eine primäre Veränderung der Zellmembran im Sinne eines Herauslösens von Phospholipiden, gleichfalls eine Veränderung der Eigenschaften der NaKATPase zu verursachen (15, 19, 20).

Die vorliegende Kinetik der NaKATPase wurde nach einer modifizierten Methode von Schmidt und Dubach (24) am

unbehandelten lyophilisierten Homogenat eines Operationspräparates einer menschlichen Niere, das sich makroskopisch und histologisch als unauffällig erwies (s.Seite 3), erarbeitet. Im Vergleich zu den oben erwähnten Arbeitsweisen, insbesondere zu der von Tulloch et al (30) durchgeführten kinetischen Untersuchung der NaKATPase an einer mit 0,1%iger DOC-Lösung vorbehandelten Mikrosomenfraktion der menschlichen Niere zeigte es sich, daß die hier angewandte Methode den großen Vorteil hat, daß sie bei schonendster Homogenataufarbeitung, bei der praktisch in vivo Verhältnisse vorliegen, zu einem, für die Analyse der NaKATPase günstigen, äußerst hohen Anteil des Enzyms an der Total-ATPase führt (im Nierenmark 77,4%, in der Nierenrinde 52%). Hinzu kommt, daß die erzielten absoluten Aktivitätswerte der NaKATPase für den Nachweis des Enzyms bei weitem ausreichend sind. Sie liegen im Nierenmark bei durchschnittlich 11,3 MKH, in der Nierenrinde bei 4,9 MKH.

Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Methoden ist dadurch gegeben, daß durch die Lyophilisierung das Homogenat über Monate bei mindestens -30^{o} C ohne erkennbaren Verlust der NaKATPase-Aktivität aufbewahrt werden kann (7, 24).

Schließlich ist es durch die angewandte mikrobiochemische Analysenmethode, die sich dadurch auszeichnet, daß sie mit geringsten Lösungsvolumina (1 μl bis 1000 μl) und Homogenatmengen (800 ng Trockengewicht/10 μl Ansatz) arbeitet, in Verbindung mit der hochempfindlichen Meßmethode der Fluorimetrie möglich, umfangreiche Untersuchungen an kleinen Gewebsmengen, z.B. Biopsiematerial, durchzuführen.

B.) Ergebnisse

Das Herzglykosid Ouabain (Strophantin G) ist, wie auch andere herzwirksame Glykoside, ein spezifischer Hemmstoff der NaKATPase (2, 5, 8, 9, 21, 22, 32). Diese Hemmwirkung, die an bestimmte Strukturmerkmale der Glykoside geknüpft ist (22), konnte sowohl in vivo als auch in vitro nachgewiesen werden (2).

Beim menschlichen lyophilisierten Nierenmarkhomogenat liegt die Ouabainkonzentration, die eine halbmaximale Hemmung der NaKATPase verursacht bei $10^{-6,4}$ M. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die in der Mikrosomenfraktion des menschlichen Herzmuskels (10, 11) und der menschlichen Erythrozyten (9) gefundenen Werte, die bei 10^{-6} M bzw. $10^{-6,9}$ M Ouabain liegen. Dagegen ist die NaKATPase der Mikrosomenfraktion der menschlichen Niere (30) weniger empfindlich, da hier eine Ouabainkonzentration von $10^{-5,5}$ M zur halbmaximalen Hemmung des Enzyms benötigt wird.

Die Restaktivität der NaKATPase von durchschnittlich 26% im Bereich zwischen 10^{-6} M und 10^{-2} M Ouabain ist Folge des im Medium A vorhandenen Kaliums, das das Ouabain kompetitiv von seinem Wirkungsort verdrängt (28). Ist dagegen wie im Medium D kein Kalium vorhanden, so ist bereits bei einer geringeren Ouabainkonzentration als im Medium A eine vollständige Hemmung der NaKATPase zu beobachten. Umgekehrt konnten Dunham und Glynn (9) zeigen, daß die hemmende Wirkung geringer Ouabainkonzentrationen durch eine Erhöhung der Kaliumkonzentration zurückgedrängt werden kann.

Die differente Wirkung des Ouabains auf die NaKATPase, nämlich eine Hemmung des Enzyms bei hoher bzw. eine Stimulierung bei niedriger Ouabainkonzentration, wie sie Abb.1 zeigt, ist ein Effekt, der von vielen Autoren in den Organen verschiedenster Spezies beobachtet wurde (4, 6, 24).

Wie bereits oben erwähnt, wird in der Literatur häufig eine Steigerung der NaKATPase-Aktivität durch Vorbehandlung

des Gewebes mit Desoxycholat (DOC) beschrieben, die zur besseren Erfassung des Enzyms ausgenützt wird.

Die Reaktion der NaKATPase und der MgATPase auf DOC-Behandlung in den Geweben verschiedener Spezies ist unterschiedlich. So bewirkt die Vorbehandlung des lyophilisierten Rattennierenhomogenats mit einer DOC-Konzentration von 2 mM eine völlige Hemmung der NaKATPase bei starker Reduktion der MgATPase (24), während in den subzellulären Fraktionen des Rattennierengewebes bei Vorbehandlung mit einer DOC-Konzentration von 2,4 mM eine ca. 3-fache Steigerung der NaKATPase-Aktivität und eine annähernd gleichbleibende MgATPase-Aktivität von Jørgensen (15) beschrieben wurde, wie dies auch Skou und Hilberg (29) in der Mikrosomenfraktion der Rattenniere bestätigt sahen.

Im Gegensatz zur Ratte war im menschlichen lyophilisierten Nierenhomogenat eine konzentrationsabhängige biphasische Wirkung von DOC auf die NaKATPase festzustellen. Konzentrationen bis zu 1 mM bewirkten eine Steigerung der Enzymaktivität bis zu 86% bei unveränderter MgATPase, während höhere DOC-Konzentrationen eine vollständige Hemmung sowohl der NaKATPase als auch der MgATPase bewirkten. Dagegen beobachtete Tulloch et al. (30) in der Mikrosomenfraktion der menschlichen Niere bei Vorbehandlung des Homogenats mit einer 0,1%igen DOC-Lösung, was umgerechnet einer 2,4 mM Lösung entspricht, sowohl eine Steigerung der NaKATPase um ca.50% als auch der MgATPase um ca. 24%.

Der Wirkungsmechanismus von DOC ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Die Feststellung von Jørgensen (15), daß der Effekt der Steigerung der NaKATPase durch DOC nicht auf einer Umwandlung der MgATPase in eine Na^+-K^+- stimulierbare ATPase erklärt werden kann, ist durch die vorliegende Untersuchung bestätigt, da trotz völlig unveränderter MgATPase-Aktivität eine Steigerung der NaKATPase-Aktivität zu beobachten ist. Das unterschiedliche Verhalten der ATPasen auf DOC-Behandlung erklärt sich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß es sich bei der NaKATPase und der MgATPase um getrennte, an die Zellmembran gebundene Enzyme handelt (15)

und das DOC über eine Veränderung der Membranen sekundär auf die Fermente wirkt (19).

Vergleicht man den Einfluß der Mg^{++}- und der ATP-Konzentration auf die NaKATPase, so ist ersichtlich, daß bei einer Konzentration der beiden Stoffe von 2,5 mM die Enzymaktivität ihr Maximun erreicht. Daraus ergibt sich ein zur optimalen Aktivierung der NaKATPase erforderlicher Mg^{++}/ATP-Quotient von 1, wie er auch von vielen Autoren in den unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies gefunden worden ist (9, 21, 23, 24, 27).

Wird in der vorliegenden Untersuchung die Mg^{++}-Konzentration über diesen Quotienten hinaus erhöht, so ist ein unterschiedliches Verhalten der beiden ATPasen festzustellen. Während die MgATPase unverändert bleibt, ist bei der NaKATPase eine deutliche Reduktion ihrer Aktivität zu beobachten. Geht man davon aus, daß das ATP, in Form eines Na_2MgATP-Komplexes (13,21), das spezifische Substrat der NaKATPase ist und daß die NaKATPase-Aktivität obligat die Anwesenheit von Na^+-Ionen erfordert (21), so ist eine Erklärung der Hemmung des Enzyms dadurch möglich, daß man eine Verdrängung der Na^+-Ionen durch die überschüssigen bivalenten Mg^{++}-Kationen aus dem ATP-Komplex bzw. von den Bindungsstellen an dem Enzym annimmt, wie dies Portius und Repke (21) bzw. Järnefelt (14) für das bivalente Kation Ca^{++} angedeutet haben.

Die Hemmung, die eine über das äquimolare Verhältnis von Mg^{++} und ATP hinausgehende ATP-Konzentrationserhöhung sowohl bei der MgATPase als auch bei der NaKATPase verursacht, ist eine Reaktionshemmung vom Typ der Substrathemmung (24). Bei der NaKATPase kommt hinzu, daß das ATP nicht mehr vollständig als reaktionsfreudiger Na_2MgATP-Komplex vorliegt, sondern zum Teil in Form des NaATP's, das einen wesentlich weniger aktiven Komplex mit der NaKATPase bildet.

Aus den Untersuchungen über den Einfluß von Na^+- bzw. K^+-Ionen auf die NaKATPase geht hervor, daß bei einer konstanten Na^+-Konzentration von 50 mM die Enzymaktivität im schmalen Bereich zwischen 5 und 10 mM K^+ rasch ihr Optimum erreicht. Hält man dagegen die K^+-Konzentration mit 5 mM konstant und gibt Na^+-Ionen in steigender Konzentration zu, so erreicht man bei vergleichsweise langsamem Anstieg, das Aktivitätsoptimum erst bei 50 mM Na^+. Die Aktivität der NaKATPase wird also von K^+-Ionen in einem schmalen, von Na^+-Ionen in einem weiten Bereich beeinflußt, wie dies auch von Portius und Repke (20) beschrieben wurde.

Bei einer Erhöhung der Konzentration eines der beiden monovalenten Kationen über die angegebenen Werte hinaus tritt eine Reduktion der NaKATPase-Aktivität auf. Skou (26) vermutete, daß dieses Verhalten auf ein Konkurrieren der beiden Ionen um Bindungsstellen an der Zellmembran zurückzuführen ist. Weiterführende Untersuchungen von Skou (27, 28) und von Wheeler und Whittham (32) bestätigten diese Vermutung, da sie zeigen konnten, daß sich Na^+ und K^+ mit unterschiedlicher Affinität an getrennten Bindungsorten an das Enzym anlagern. Sie konnten jedoch in ihren Untersuchungen lediglich die Hemmung der NaKATPase bei hoher K^+-Konzentration erklären, da sie herausfanden, daß wohl K^+-Ionen in hoher Konzentration die Na^+-Ionen, jedoch nicht umgekehrt die Na^+-Ionen die K^+-Ionen von ihrem Bindungsort verdrängen können und daß der Na^+ und K^+ umfassende Enzymkomplex weitaus aktiver ist als der Komplex, an den nur K^+ gebunden ist.

Schmidt und Dubach (24) fanden als weiteren Grund für die Hemmung der NaKATPase im lyophilisierten Rattennierenhomogenat eine durch die hohe Na^+- bzw. K^+-Konzentration hervorgerufene Konformationsänderung des Enzymmoleküls.

Aus der Untersuchung des Einflusses steigender Konzentrationen von lyophilisiertem menschlichem Nierenhomogenat auf die Hydrolyse von ATP geht hervor, daß die Hydrolysengeschwindigkeit bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten

proportional zur Gewebskonzentration im Bereich zwischen 200 ng und 1600 ng Trockengewicht / 10 µl Ansatz ist. In Kenntnis der Tatsache, daß bei höheren Gewebskonzentrationen eine Reduktion der NaKATPase auf Grund einer Substratverarmung und Produkthemmung auftritt (24, 32), wurden alle kinetischen Analysen mit 800 ng Gewebstrockengewicht / 10 µl Ansatz durchgeführt.

Bei einer 30minütigen Inkubationszeit errechnet sich im Mark für die Total-ATPase ein ATP-Verbrauch von 24%, für die MgATPase von 12%, dies entspricht einer Absolutmenge von 0,62 mM ATP bzw. 0,31 mM ATP.

Durch die Auftrennung des Nierengewebes in Rinden- und äußere Markanteile war es möglich, die Aktivitätsverteilung der NaKATPase in der Niere grob zu differenzieren. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität im äusseren Mark des lyophilisierten menschlichen Nierengewebes um das 2,9fache höher liegt, als in der Rinde, während Tulloch (30) in der Mikrosomenfraktion des Marks eine 1,5fach höhere Aktivität fand. Entsprechende Untersuchungen am Nierengewebe anderer Spezies zeigten dieselbe Tendenz. So fand Bonting (7) bei der Katze eine 2fach, Hendler et al. (12) beim Hund eine 4fach, bei der Ratte eine 2,5fach und Jørgensen (16) beim Kaninchen eine 3fach höhere Aktivität der NaKATPase im Mark als in der Rinde. Diese signifikant höhere Aktivität im Mark hat mit großer Wahrscheinlichkeit ihre Ursache in den in dieser Zone verlaufenden distalen Abschnitten des Nephrons, in denen eine hohe aktive Resorption von Na^+ gegen einen elektrochemischen Gradienten nachgewiesen werden konnte (13, 31). Geht man von der Voraussetzung aus, daß die Na-K-Pumpe mit der NaKATPase identisch ist, so deutet dies darauf hin, daß in diesen Nephronabschnitten eine hohe Konzentration der NaKATPase zu erwarten ist.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, beträgt der prozentuale Anteil der NaKATPase an der Total-ATPase im Mark 77%, in der Rinde lediglich 52%. Tulloch (30) fand dagegen in der

Mikrosomenfraktion, sowohl des Marks als auch der Rinde der menschlichen Niere, ungefähr gleich große Anteile der NaKATPase an der Total-ATPase, die bei 74% bzw. 71% liegen. Vergleicht man diese Werte mit denen von anderen Spezies (5, 7), so ist ersichtlich, daß sie für das Nierengewebe bisher die höchst gefundenen darstellen. Sie werden nur noch von denen der menschlichen Retina und des Katzengehirns übertroffen (7).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich die hier beschriebene Kinetik der NaKATPase im lyophilisierten menschlichen Nierenhomogenat in Bezug auf die Effektoren Ouabain, Desoxycholat, Mg^{++}, ATP, Na^{+} und K^{+} nur unwesentlich von ähnlichen Untersuchungen unterscheidet, die sowohl am Nierengewebe als auch an anderen Geweben der Ratte, des Kaninchens, des Hundes und der Katze durchgeführt wurden, so daß bisher Speziesunterschiede hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften des Enzyms nicht in Erscheinung getreten sind.

V.) ZUSAMMENFASSUNG

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Kinetik der NaKATPase, dem biochemischen Äquivalent der Na-K-Pumpe, wurde am unbehandelten lyophilisierten menschlichen Nierenhomogenat nach einer Methode von Schmidt und Dubach erarbeitet.

Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, daß zu ihrer Durchführung nur geringste Gewebsmengen (hier wurden pro Ansatz 800 ng Homogenat / 10 µl H_2O aufgeschwemmt) notwendig sind und daß durch das schonende Homogenisieren des Gewebes in Aqua bidest und die anschließende Lyophilisierung zu Trockenhomogenat die Gefahr einer Strukurveränderung des Enzymmoleküls weitgehend ausgeschlossen ist. Darüber hinaus bietet die Lyophilisierung des Homogenats die Möglichkeit, das Gewebe über Monate ohne erkennbaren Aktivitätsverlust der NaKATPase in tiefgekühltem Zustand aufzubewahren.

Die unter Anwendung dieser Methode erarbeitete Kinetik der NaKATPase ist im wesentlichen durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- Ouabain zeigt eine biphasische Wirkung auf die NaKATPase. Hohe Konzentrationen wirken hemmend, niedrige stimulierend auf das Enzym. Die halbmaximale Hemmung wird bei einer Ouabainkonzentration von $10^{-6,4}$ M erreicht.
- Mit Desoxycholat ist bei einer Konzentration von 10^{-3} M eine 86%ige Stimulierung der NaKATPase zu erzielen, während die MgATPase völlig unbeeinflußt bleibt. Höhere Konzentrationen üben dagegen auf beide Fermente einen hemmenden Einfluß aus.
- Mg^{++} und ATP bewirken bei einer äquimolaren Konzentration von 2,5 mM, was einem Mg^{++} / ATP Quotienten von 1 entspricht, eine maximale Aktivierung der NaKATPase.

—Die zur optimalen Ausschöpfung der Aktivität der NaKATPase notwendige Na^+- und K^+- Konzentration liegt bei 50 mM bzw. 5 mM, woraus sich ein Verhältnis von $Na^+ : K^+ = 10 : 1$ ergibt.

Bei der Untersuchung der absoluten Aktivität der NaKATPase in dem nach äußerem Mark und Rinde aufgeteilten Nierengewebe ergaben sich vor allem im Mark sehr hohe Werte. So konnte im äußeren Mark eine Aktivität von 11,26 MKH, in der Rinde von 4,92 MKH gemessen werden.

Vergleicht man die hier beschriebenen Eigenschaften der NaKATPase im lyophilisierten menschlichen Nierenhomogenat mit denjenigen, die von anderen Autoren in den unterschiedlichsten Geweben beschrieben wurden, so läßt sich feststellen, daß sie, abgesehen von geringfügigen Abweichungen, die auf die Verschiedenheit der angewandten Methoden zurückzuführen sind, in den wesentlichen Merkmalen übereinstimmen.

Es konnte also gezeigt werden, daß sich die NaKATPase des menschlichen Nierengewebes hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften wie die anderer Spezies verhält und daß sich das menschliche Nierengewebe durch eine besonders hohe absolute NaKATPase-Aktivität auszeichnet.

VI.) ZAHLENTABELLEN

Die Werte sind in MKH, d.h. Mol freigesetztes anorganisches Phosphat / kg Gewebstrockengewicht / Stunde, angegeben. Jeder angegebene Wert stellt einen Mittelwert aus 3 Analysen dar.

Parameter mM		Total-ATPase MKH	MgATPase MKH	NaKATPase MKH
Mg^{++}	0	1,32	1,11	0,21
	0,5	3,16	1,75	1,41
	1	3,38	1,78	1,60
	2	4,09	2,06	2,03
	3	4,06	2,06	2,00
	4	3,72	2,06	1,66
	6	3,26	2,08	1,18
ATP	0,1	1,95	1,23	0,72
	1	8,43	3,80	4,63
	2	11,73	3,81	7,92
	2,5	12,23	3,80	8,43
	3	12,34	3,74	8,60
	5	8,22	1,34	6,88
Na^{+}	0	4,22	2,83	1,77
	5	5,71		3,26
	25	7,18		4,73
	50	8,71	2,43	6,26
	100	7,83		5,38
	150	7,49		5,04
	200	6,67	2,11	4,22
K^{+}	0	2,45		0,33
	2,5	6,87		4,75
	5	7,04		4,92
	7,5	7,20		5,08
	10	7,04	∅ 2,12	4,92
	15	7,04		4,92
	20	7,04		4,92
	40	6,46		4,34

Parameter	M	Total-ATPase MKH	MgATPase MKH	NaKATPase MKH
Ouabain im Medium D	10^{-2}		2,34	
Ouabain im Medium A	0	5,25		2,91
	10^{-8}	7,10		4,76
	10^{-7}	7,10		4,76
	10^{-6}	3,17		0,83
	10^{-5}	3,41		1,07
	10^{-4}	3,00		0,66
	10^{-3}	3,16		0,82
	10^{-2}	2,75		0,41
	$10^{-1,19}$	2,41		0,07
Na-DOC-Konzentration im Vorinkubationsmedium	0	3,97	0,70	3.27
	10^{-5}	4,58	0,70	3,88
	10^{-4}	4,70	0,85	3,85
	10^{-3}	6,75	0,73	6,02
	10^{-2}	0,53	0,12	0,41
Zum Vergleich reines H_2O als Vorinkubationsmedium	H_2O	4,07	0,85	3,22

Parameter		Total-ATPase	MgATPase	NaKATPase
	ng Homogenat / 10ul Ansatz	Mol $P_i \cdot 10^{-8}$ 30 min	Mol $P_i \cdot 10^{-8}$ 30 min	Mol $P_i \cdot 10^{-8}$ 30 min
Markhomogenat-konzentration	199	0,153	0,026	0,127
	399	0,280	0,069	0,211
	798	0,623	0,137	0,486
	1596	1,042	0,288	0,754
Rindenhomogenat-konzentration	200	0,089	0,033	0,056
	401	0,163	0,069	0,094
	803	0,313	0,178	0,135
	1606	0,658	0,370	0,288

VII.) LITERATURVERZEICHNIS

1. Arnold, M.: Histochemie. Einführung in die Grundlagen und Prinzipien der Methoden.

Springerverlag Berlin, Heidelberg, New York (1968)

2. Baker, P.F.: Die Natriumpumpe

Endeavour 96, 166-173 (1966)

3. Bakkeren, J.A.J.M., Bonting, S.L.: Studies on (Na K)-activated ATPase. XX. Properties of (Na K)-activated ATPase in rat liver.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 150, 460-466 (1968)

4. Bonting, S.L., Caravaggio, L.L., Canady, M.R., Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. XI. The salt gland of the herring gull.

Arch. Biochem. Biophys. 106, 49-56 (1964)

5. Bonting, S.L., Caravaggio, L.L. Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. IV. Correlation with cation transport senitive to cardiac glycosides.

Arch. Biochem. Biophys. 98, 413-419 (1962)

6. Bonting, S.L., Hawkins, N.M., Canady, M.R.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. VII. Inhibition by erythrophleum alkaloids.

Biochem. Pharmacol. 13, 13-22 (1964)

7. Bonting, S.L., Simon, H.A., Hawkins, N.M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat.

Arch. Biochem. Biophys. 95, 416-423 (1961)

8.) Dunham. E.T., Glynn, I.M.: Adenosine triphosphatase activity and ion movements.

J. Physiol. (London) 152, 61-62 (1960)

9.) Dunham, E.T., Glynn, I.M.: ATPase activity and the active movements of alkali metal ions.

J. Physiol. (London) 156, 274-293 (1961)

10.) Gibson, K., Harris, P.: Some properties of human myocardial microsomal (Na^+ K^+)-ATPase.

Cardiovascular Research. 2, 367-370 (1968)

11.) Gibson, K., Harris, P.: (Na^+ K^+)-ATPase activity in a preparation from human post-mortem myocardium.

Cardiovascular Research. 4, 201-206 (1970)

12.) Hendler, E.D., Torretti, J., Epstein, F.H.: The distribution of sodium potassium-activated adenosine triphosphatase in medulla and cortex of the kidney.

J. clin. Invest. 50, 1329-1337 (1971)

13.) Hyman, E.S.: Transfer of metabolic energy to sodium.

Nature, London. 211, 836-837 (1966)

14.) Jarnefelt, J., Stedingk von L.V.: Some properties of the ATP-dependent-Na^+-binding system of rat brain microsomes.

Acta physiol. scand. 57, 328-338 (1963)

15.) Jørgensen, P.L.: Regulation of the (Na^+ K^+)-activated ATP hydrolyzing of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 151, 212-224 (1968)

16.) Jørgensen, P.L., Skou, J.C.: Preparation of highly active (Na^+ K^+)-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 39-46 (1969)

17.) Katz, A.J., Epstein, F.H.: The role of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium by the kidney.

J. clin. Invest. 46, 1999-2011 (1967)

18.) Lowry, O.H. and J.V. Passoneau: Some recent refinements of Quantitative Histochemical analysis.

In: Dubach, U.C. and U. Schmidt: Recent advances in Quantitative Histo-and Cytochemistry
In: Current problems in clinical biochemistry 3, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna, 1971

19.) Palade, G.E., Siekevitz, P.: Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study.

J. biophys. biochem. Cytol. 2, 171-200 (1956)

20.) Portius, H.J., Repke, K.R.H.: Darstellung des Na^++ K^+-aktivierten Mg^{++}-abhängigen Adenosintriphosphat Phosphohydrolase-Systems des Herzmuskels durch Isolierung der Zellmembran.

Acta biol. med. germ. 19, 879-906 (1967)

21.) Portius, H.J., Repke, K.R.H.: Eigenschaften und Funktion des Na^++K^+-aktivierten Mg^{++}-abhängigen Adenosintriphosphat Phosphohydrolase-Systems des Herzmuskels.

Acta biol. med. germ. 19, 907-938 (1967)

22.) Repke, K.R.H., Portius, H.J.: Ober die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalisrezeptorenzym.

Experientia (Basel) 19, 452-458 (1963)

23.) Ridderstap, A.S., Bonting, S.L.: Na^+ K^+- activated adenosine triphosphatase and pancreatic secretion in the dog.

Amer. J. Physiol. 216, 547-553 (1969)

24.) Schmidt, U. und U.C. Dubach: Quantitative Histochemie am Nephron.

In: Progr. Histochem. Cytochem. 2, 185-298 (1971) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Portland-Oregon-USA, 1971

25.) Siebert, G.: Andere Adenosintriphosphatasen (Nucleosid-triphosphatasen).

In: Hoppe-Seyler/Thierfelder Enzyme Bd.6, 439-448 (1966)

26.) Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 23, 394-401 (1957)

27.) Skou, J.C.: Further investigations on a (Mg^{++}+ Na^+)-activated adenosine triphosphatase possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 42, 6-23 (1960)

28.) Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane.

Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965)

29.) Skou, J.C., Hilberg, C.: The effect of cations, g-strophanthin and oligomycin on the labeling from (^{32}P)ATP of the (Na^+ K^+) activated enzyme system and the effect of cations and g-strophanthin on the labeling from (^{32}P)ITP and $^{32}P_i$.

Biochim. biophys. Acta (Amst.) 185, 198-219 (1969)

30.) Tulloch, B.R., Gibson, K., Harris, P.: Distribution and properties of Na^+, K^+-ATPase in human post-mortem kidney and the effects of diuretics.

Clinical Science 42, 265-275 (1972)

31.) Ullrich, K.J.: Renal transport of sodium.

Proc. III. Intern. Congr. Nephrol. Washington (1966), Vol. I, 48-56. Ed.: J.S. Handler.-S. Karger, Basel, New York 1967

32.) Wheeler, K.P., Whittham, R.: Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport.

Biochem. J. 85, 495-507 (1962)

NACHWORT

Herrn Universitätsdozent Dr. med. U. Schmidt danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die angenehmen Arbeitsbedingungen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 31.1.1949 wurde ich, Hermann Adolf Hornstein, als erstes Kind des Posthauptsekretärs Adolf Hornstein und seiner Ehefrau Lore Hornstein geb. Ott in Reutlingen geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Metzingen, an dem ich am 14.6.1969 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1.7.1969 bis zum 31.12.1970 wurde ich als Wehrpflichtiger zur Bundeswehr einberufen.

Im Sommersemester 1971 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Tübingen. Das 2. und 3. Semester studierte ich an der Universität Freiburg, wo ich am 23.3.1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand. Die ärztliche Vorprüfung legte ich am 27.9.1973 und mein medizinisches Staatsexamen am 21.12.1976 an der Universität Tübingen ab.

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/ 61 06 41 / 42

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststraße 58, 7000 Stuttgart 1
Telefon 0711/ 61 06 41 / 42